Tubes Leucosep

LTK.615

NOTICE

Pour test diagnostique *in vitro*

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

Instructions

Utilisation visée

Les tubes Leucosep sont conçus pour être utilisés en vue du recueil et de la séparation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à partir de sang entier. Ces tubes facilitent la séparation des PBMC à partir de sang entier au moyen de la procédure FICOLL-PAQUE* PLUS avant utilisation de ces cellules lors de tests ELISPOT.

Introduction

La technique ELISPOT utilise des cellules T dans les PBMC qui ont été séparées du sang entier. L'une des méthodes de séparation de ces cellules nécessite l'utilisation de FICOLL-PAQUE PLUS. Cette procédure implique un certain nombre d'étapes qui devront être réalisées avec soin pour assurer des résultats optimaux. L'utilisation des tubes Leucosep diminue le nombre d'étapes, rend la procédure plus robuste et raccourcit le délai nécessaire à la procédure de séparation.

Principe de la méthode

Les tubes Leucosep ont été conçus pour réaliser la séparation optimale des PBMC à partir de sang entier humain au moyen d'une centrifugation en gradient de densité. Les tubes Leucosep sont constitués d'un tube de polypropylène transparent comprenant une barrière poreuse. Cette barrière biologiquement inerte est composée de polyéthylène de qualité supérieure. L'utilisation des tubes Leucosep permet d'éliminer la tâche longue et laborieuse du dépôt de l'échantillon sur FICOLL-PAQUE PLUS. Le sang entier anticoagulé est mélangé au milieu de culture, puis versé dans un tube Leucosep. La barrière poreuse évite que le sang ne se mélange au milieu de séparation (FICOLL-PAQUE PLUS). Lors de la centrifugation, les PBMC sont isolées des érythrocytes non-désirés grâce à leur différence de densité. Elles sont recueillies dans l'interface au-dessus du milieu de séparation. Lorsque la séparation est terminée, la barrière évite la recontamination de la couche de PBMC lors de son prélèvement.

Avertissements et précautions

1. Pour test diagnostique *in vitro* seulement.
2. Pour utilisation professionnelle seulement. Les techniciens doivent être formés à l'utilisation de cette procédure.
3. Les échantillons sanguins doivent être considérés comme potentiellement dangereux. Des précautions doivent être prises lors de la manipulation de produits d'origine humaine.
4. La manipulation lors de l'utilisation, de la conservation et de l'élimination des échantillons de sang total et des composants des tests doit être effectuée en conformité avec les procédures définies dans les directives ou règlements nationaux relatifs à la sécurité en cas de risque biologique.
5. Tout écart par rapport aux procédures recommandées vis-à-vis des techniques de pipetage, de lavage, les temps de centrifugation et/ou les températures, peut altérer la pureté des PBMC et influencer les résultats des tests.
6. Ne pas prélever le sang sur des tubes CPT™ (Cell Preparation Tubes, Becton Dickinson) ou EDTA, car ceux-ci sont incompatibles avec les tubes Leucosep.
7. Ne pas réfrigérer ni congeler les échantillons de sang total. Conserver et transporter les échantillons sanguins au laboratoire entre 18 et 25 °C ou entre 10 et 25 °C si les échantillons doivent être traités avec le réactif T-Cell *Xtend*™.
8. Le sang ne doit pas être conservé pendant plus de 8 heures ou pendant plus de 32 heures s'il est traité ensuite avec le réactif T-Cell *Xtend*.
9. N'utiliser que des contenants jetables pour le recueil de l'échantillon de sang veineux.
10. Ne pas utiliser après la date de péremption.
11. Observer des techniques aseptiques lors de l'utilisation de ce produit.
12. Conserver les tubes Leucosep à l'abri de la lumière directe.
13. Ne pas utiliser si les tubes Leucosep sont endommagés ou le FICOLL-PAQUE PLUS est détérioré, comme l'indique l'apparition d'une couleur jaune caractéristique ou de particules dans la solution limpide.

Matériel fourni

Chaque boîte contient :

50 tubes Leucosep pré-remplis de FICOLL-PAQUE PLUS.

CD contenant la notice et la fiche signalétique des données de sécurité.

Conservation et stabilité

Conserver non ouvert entre 4 et 30 °C jusqu'à l'expiration de la date de péremption indiquée sur la boîte. Conserver le produit ouvert à température ambiante (18-25 °C) et utiliser dans les 12 semaines qui suivent l'ouverture de l'emballage extérieur ou au plus tard avant la date de péremption indiquée sur la boîte, soit avant la première de ces deux échéances.

Équipement et matériel requis, mais non fournis

1. Tubes de prélèvement sanguin héparines.
2. Milieux de culture cellulaire AIM V® et RPMI.
3. Tubes de centrifugation de 15 mL.
4. Centrifugeuse pour le fractionnement des PBMC, capable d'au moins 1 000 x g et de maintenir les échantillons à température ambiante (18-25 °C).
5. Enceinte de sécurité biologique de niveau (BL2) (recommandée).
6. Pipettes et embouts de pipette stériles.
7. Kit ELISPOT.
8. Le réactif T-Cell *Xtend* sera nécessaire si des échantillons vieux de plus de 8 heures sont utilisés.

Procédure

Remarque : Les étapes suivantes doivent être réalisées selon les principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire.

1. S'assurer de placer le nombre nécessaire de tubes Leucosep à température ambiante (18-25 °C) avant utilisation.
2. Si le FICOLL-PAQUE PLUS s'est déplacé au-dessus de la barrière poreuse, centrifuger les tubes Leucosep à 350 x g pendant une minute pour déplacer le FICOLL-PAQUE en dessous de la barrière.
3. Renverser l'échantillon de sang entier puis diluer à raison de 5 parts de sang pour 3 parts de milieu de culture AIM V ou RPMI dans un tube de centrifugation de 15 mL. Renverser le tube de centrifugation plusieurs fois pour mélanger.
4. Verser le sang dilué directement dans le tube Leucosep et centrifuger à 1 000 x g pendant 10 minutes à 18-25 °C sans frein.
5. Aspirer la couche trouble de PBMC et compléter jusqu'à environ 10 mL avec l'AIM V ou RPMI dans un tube de centrifugation de 15 mL. Renverser le tube de centrifugation pour mélanger.
6. Centrifuger à 600 x g pendant 7 minutes. Éliminer le surnageant.
7. Resuspendre le culot cellulaire avec de l'AIM V ou RPMI, compléter jusqu'à environ 10 mL avec de l'AIM V ou du RPMI puis centrifuger à 350 x g pendant 7 minutes.
8. Éliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans le volume d'AIM V (**ne pas utiliser** de RPMI) nécessaire pour le test ELISPOT.
9. Si des cellules sont nécessaires pour une stimulation antigénique lors d'un test ELISPOT, diluer les cellules le cas échéant avec de l'AIM V (**ne pas utiliser** de RPMI).

Limites

1. Comme avec d'autres milieux de séparation, les tubes Leucosep peuvent altérer la proportion de certaines sous-populations de PBMC (ex. cellules T et B) par rapport à celles dans le sang total non séparé. On estime que cette altération est relativement insignifiante dans les cas normaux.

Contrôle de la qualité

Des tests internes n'ont montré aucune diminution significative du rendement de PBMC lorsque l'on compare FICOLL-PAQUE PLUS en utilisant des tubes Leucosep. En tant que partie intégrante des activités de contrôle de la qualité d'un laboratoire individuel, les méthodes de numération cellulaire

doivent être conçues et validées afin de s'assurer que suffisamment de PBMC ont été obtenues pour le système de test approprié. De plus, les activités de contrôles de la qualité doivent faire usage de contrôles positifs et négatifs conçus pour garantir la performance attendue des cellules T dans le système de test approprié.

Caractéristique de la performance

Sang conservé, avec le réactif T-Cell *Xtend*

Deux échantillons de sang de 6 ml ont été obtenus auprès de 46 donneurs. Un échantillon de sang de chaque donneur a été traité dans les 8 heures qui ont suivi la ponction veineuse par dépôt manuel sur une couche de FICOLL*. Le deuxième échantillon a été traité en utilisant un tube Leucosep après 29 à 32 heures de conservation, avec le réactif T-Cell *Xtend.*

En utilisant les deux méthodes, un nombre suffisant de cellules a été obtenu pour que les échantillons puissent être utilisés dans un test ELISPOT et les cellules obtenues de tous les échantillons étaient fonctionnelles dans le test.

Sang frais

Deux échantillons de 6 ml ont été obtenus auprès de 52 donneurs. Les deux échantillons de chaque donneur ont été traités dans les 8 heures qui ont suivi la ponction veineuse. Le premier échantillon a été traité par dépôt manuel sur une couche de FICOLL. Le deuxième échantillon a été traité en utilisant un tube Leucosep.

En utilisant les deux méthodes, un nombre suffisant de cellules a été obtenu pour que les échantillons puissent être utilisés dans un test ELISPOT et les cellules obtenues de tous les échantillons étaient fonctionnelles dans le test.

Solutions en cas de problèmes lors du recueil et de la séparation des PBMC en vue d'un test ELISPOT

Problème	Cause potentielle	Solution possible
Faible rendement cellulaire	Leucopénie	Ajouter un tube de prélèvement sanguin supplémentaire
	Recueil sanguin inadéquat	Les tubes de prélèvement CPT ou contenant de l'EDTA ne sont pas compatibles avec les tubes Leucosep
	Le tube de prélèvement sanguin n'est pas à température ambiante (18-25 °C)	Laisser le tube de prélèvement sanguin se stabiliser à température ambiante
	Le sang n'est pas conservé à la température voulue	S'assurer que le transport du sang s'effectue à une température comprise entre 18 et 25 °C ou entre 10 et 25 °C si le réactif T-Cell *Xtend* est utilisé
	Utilisation de dilutions ou de volumes autres que ceux recommandés	S'assurer que les consignes adéquates sont suivies

Contamination par des globules rouges	Le sang n'est pas conservé à la température voulue	S'assurer que le sang est transporté à une température comprise entre 18 et 25 °C ou entre 10 et 25 °C si le réactif T-Cell Xtend est utilisé
	Le tube de prélèvement sanguin n'est pas à température ambiante (18-25 °C)	Laisser le tube de prélèvement sanguin se stabiliser à température ambiante
	Le sang n'est pas dilué	S'assurer que le sang est dilué selon la procédure
	Renversement de l'échantillon sang à l'intérieur du tube Leucosep	S'assurer que le tube Leucosep reste en position verticale avant la centrifugation
	Centrifugation inadéquate	S'assurer que les consignes de centrifugation sont suivies Vérifier que la centrifugeuse est en mesure de maintenir une température comprise entre 18 et 25 °C Vérifier que le frein de la centrifugeuse est en position arrêt
	Séparation des échantillons incomplète	Allonger l'étape de centrifugation de 10 min
Aucune couche définie ou distincte de cellules mononuclées	Séparation des échantillons incomplète	Allonger l'étape de centrifugation de 10 min
	La centrifugeuse n'est pas adéquatement calibrée	Faire calibrer la centrifugeuse
	Centrifugation inadéquate	S'assurer que les consignes de centrifugation sont suivies
	Échantillon hyperlipidémique	Recueillir un échantillon de sang à jeun
Résultats non valides	Un certain nombre de problèmes de manipulation de l'échantillon peuvent être à l'origine de résultats non valides	Se référer aux rubriques ci-dessus

Glossaire des symboles

	À utiliser avant/Date de péremption (An-Mois-Jour)
LOT	Numéro de lot
REF	Numéro de catalogue
⚠	Attention, voir le mode d'emploi
	Fabricant
▽	Suffisant pour « n » tests
IVD	Dispositif de diagnostic *in vitro*
	Limite de température/À conserver entre
	Se référer au mode d'emploi

T-Cell *Xtend* et le logo d'Oxford Immunotec sont des marques de commerce d'Oxford Immunotec Limited.
AIM V est une marque de commerce d'Invitrogen.
CPT est une marque de commerce de Becton Dickinson.
* FICOLL et FICOLL-PAQUE sont des marques de commerce des sociétés du groupe GE.

L'utilisation du réactif T-Cell *Xtend* est protégée par les brevets et brevets en instance suivants : EP2084508; US13/253,598, CN101529221, AU2007-303994, JP2009-530943, IN2165/DELNP/2009, CA2665205

© Oxford Immunotec Limited, 2013. Tous droits réservés.

Fabricant:
Oxford Immunotec Ltd
94C Innovation Drive, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RZ, R.-U.
+44(0)1235 442796
www.oxfordimmunotec.com